

水仙内生真菌的分离及抑菌和抗肿瘤活性研究

杨明俊¹, 李娟¹, 薛鸿燕¹, 王永刚^{1*}, 马雪青², 姚广玉³

1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050

2. 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点试验室, 国家口蹄疫参考试验室, 甘肃 兰州 730046

3. 灵台县食品药品监督管理局, 甘肃 灵台 744400

摘要: **目的** 分离纯化水仙根茎中的内生真菌, 并对分离得到的真菌进行抑菌和抗肿瘤活性筛选。**方法** 用组织分离法分离纯化水仙内生真菌后, 以金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae* 和人肝癌细胞 HepG2 作为受试对象, 采用滤纸片法和 MTT 法对内生真菌菌株发酵液的醋酸乙酯提取物进行抑菌和抗肿瘤活性检测。**结果** 从水仙根茎共分离到 18 株内生真菌, 各菌株发酵液的醋酸乙酯提取物对 4 种供试细菌和 HepG2 细胞都有抑制作用。在质量浓度 10 mg/mL 时, SX-R202 和 SX-S102 对大肠杆菌和绿脓杆菌抑菌圈直径分别达到 18 mm 和 20 mm; 在质量浓度 1 mg/mL 时, SX-R201、SX-R202、SX-R203 和 SX-R204 对 HepG2 细胞增殖抑制率分别为 (86.0±1.1) %、(89.8±1.3) %、(62.9±0.9) % 和 (90.6±1.0) %。结合形态学特征和分子生物学鉴定确定 SX-R201 为尖孢镰刀菌属 *Fusarium* sp. 菌株、SX-R202 和 SX-R203 为青霉属 *Penicillium* sp. 菌株、SX-R204 和 SX-S102 为曲霉属 *Aspergillus* sp. 菌株。**结论** 水仙内生真菌的抑菌和抗肿瘤效果明显, 值得进一步研究。

关键词: 水仙; 内生真菌; 抑菌活性; 抗肿瘤活性; 代谢产物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)06-0819-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.015

Isolation of endophyte fungi in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* and their antimicrobial and antitumor activities

YANG Ming-jun¹, LI Juan¹, XUE Hong-yan¹, WANG Yong-gang¹, MA Xue-qing², YAO Guang-yu³

1. College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

2. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot and Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China

3. Lingtai County Food and Drug Administration, Lingtai 744400, China

Abstract: **Objectives** To isolate endophytic fungi from the roots and stems of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*, and to determine their antimicrobial and antitumor activities. **Methods** After isolating the endophytic fungi, the antimicrobial activity from the isolated endophytic fungi was detected using filter paper method with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* as indicator microorganisms. And the antitumor activity on HepG2 was detected by MTT assay. **Results** A total of 18 strains of the endophytic fungi were isolated. The ethyl acetate extracts of the fermentation broth had the significant antibiotic activity on almost all the indicator microorganisms, and had the apparent antitumor activity on HepG2. Among these, the antibiotic activity of strains SX-R202 and SX-S102 against *E. coli* and *P. aeruginosa* were the highest, with the inhibiting zone diameters of 18 and 20 mm, respectively, at the concentration of 10 mg/mL. And at the extracts concentration of 1 mg/mL, the inhibitory rates (IR) of strains SX-R201, SX-R202, SX-R203, and SX-R204 on HepG2 were (86.0 ± 1.1)%, (89.8 ± 1.3)%, (62.9 ± 0.9)%, and (90.6 ± 1.0)%. With the identification by morphology and molecular biology, strain SX-R201 was determined to belong to the genus *Fusarium* sp., and SX-R202 and SX-R203 to *Penicillium* sp., SX-R204 and SX-S102 to *Aspergillus* sp., respectively. **Conclusion** The results indicate that the endophytic fungi of *N. tazetta* var. *chinensis* are potential antimicrobial and antitumor resource, which deserves further studies.

Keywords: *Narcissus tazetta* var. *chinensis* M. Roem.; endophytic fungi; antimicrobial activity; antitumor activity; metabolic products

收稿日期: 2013-05-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31060041); 甘肃省自然科学基金资助项目 (0908ZTB090, 1108ZSB095, 2011GS04244); 兰州理工大学优秀青年资助计划 (1008ZCX007); 兰州理工大学教学研究项目 (JY2012045)

作者简介: 杨明俊 (1976—), 男, 副教授, 博士, 主要从事生药药理研究。E-mail: yangmj@lut.cn

*通信作者 王永刚 Tel: (0931)2976707 E-mail: 412316788@163.com

植物内生真菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部或细胞间隙的真菌,是植物微生态系统中的重要组成成分^[1-3]。在长期进化过程中形成了丰富的代谢系统,能产生和宿主植物相同、类似或结构新颖的次级代谢产物,具有促进营养物质吸收、抗病虫害、抗逆境、促植物生长等作用^[4-7]。

水仙 *Narcissus tazetta* var. *chinensis* M. Roem. 系石蒜科 (Amaryllidaceae) 水仙属 *Narcissus* L. 植物,其花姿、花色丰富,部分种类具有宜人的香味,是世界各国广泛种植的著名观赏兼药用植物^[8]。该物种为中国植物图谱数据库收录的有毒植物,全草有毒,鳞茎毒性较大,主要成分为生物碱,能引起子宫收缩,具有抑菌、抗癌和抗病毒作用^[9]。目前,关于水仙的研究主要集中在生理^[10]、组织培养^[11]、活性成分提取^[12-13]等方面,关于水仙中内生菌研究尚未见报道。本实验对水仙中内生真菌进行分离,并对其代谢产物的抑菌和抗肿瘤活性进行初步研究,以期筛选出产生抑菌活性物质和抗肿瘤物质的内生真菌,为进一步研究水仙内生真菌代谢产物的化学成分奠定基础。

1 材料

1.1 植物材料

水仙全草于2009年12月购于兰州广武花卉市场,经兰州理工大学生命科学与工程学院杨林副教授鉴定为石蒜科水仙属植物水仙 *Narcissus tazetta* var. *chinensis* M. Roem.。

1.2 指示菌株与培养基

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae*,由兰州军区总医院引进,现均保存于兰州理工大学微生物室。马铃薯培养基(PDA)和牛肉膏蛋白胨培养基,均为自制。

1.3 肿瘤细胞株

人肝癌细胞株 HepG2 由兰州大学肿瘤细胞培养室引进。

1.4 试剂与仪器

噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶(广州市鹏程生物技术有限公司);注射用丝裂霉素(MMC,浙江海正药业股份有限公司);无支原体新生小牛血清(Sigma);RPMI 1640(Gibco);升汞、醋酸乙酯、甲醇、二甲基亚砷(DMSO)等均为分析纯。酶标

仪(Elx 808, BioTek);旋转蒸发仪(RE—5286A,上海亚荣生化仪器厂);显微镜(Olympus);生化培养箱(SPX—100B—Z,上海博讯实业有限公司)。

2 方法

2.1 水仙内生真菌的分离与纯化

取新鲜健康的水仙根、鳞茎,自来水冲洗干净后,用75%乙醇浸泡3~5 min,无菌水冲洗3次,0.01%升汞浸泡30~60 s,再用无菌水冲洗3次,将植物材料剪切成0.5 cm×0.5 cm大小的片段,平放在含有100 U/mL青霉素钠和硫酸链霉素的PDA平板上,28℃恒温培养箱内培养3~10 d^[14-15]。取最后一次漂洗液涂布在含有100 U/mL青霉素钠和硫酸链霉素的PDA平板上,作为阴性对照。待皿中材料切口处长出菌丝后,采用菌丝尖端挑取法,根据菌落形态、颜色、生长时间的不同,划线稀释分离,直至获得纯培养,编号并保存菌种。

2.2 内生真菌的鉴定

参照《真菌鉴定手册》^[16],取纯化后的内生菌株,点植法接种于PDA平板上,28℃恒温培养5~8 d,期间观察其生长速度、大小、菌落纹饰、质地、边缘,分生孢子梗、分生孢子形态及大小。并采用插片法观察菌丝的显微结构,对内生真菌进行初步鉴定。同时采用真菌基因组DNA提取试剂盒分别提取分离菌株的基因组DNA,以引物ITS1、ITS4对核糖体转录间隔区ITS进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,PCR产物纯化后,送上海生物工程股份有限公司测序。获得的序列进行BLAST比对,结合形态学特征,确定分离菌株的分类地位。

2.3 内生真菌的发酵培养及活性测定样品的制备

取纯化后的菌株接种于PDA液体培养基,28℃,160 r/min恒温振荡培养8 d。发酵液经减压滤过后,用等体积的醋酸乙酯提取3次,提取液减压浓缩,得浸膏,浸膏经真空冷冻干燥(含水量小于2%)。以甲醇溶解浸膏至终质量浓度100 mg/mL,作为测试样品进行抑菌和抗肿瘤实验,4℃保存备用。

2.4 抑菌活性的测定

采用滤纸片法进行抑菌活性的检测,以革兰阳性菌金黄色葡萄球菌和革兰阴性菌大肠杆菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯菌为指示菌。将1 mL指示细菌液(约 1×10^6 CFU/mL)均匀涂布于牛肉膏蛋白胨平板上,贴上已灭菌的滤纸片(直径5 mm),吸取测试样品溶液(以甲醇稀释至10 mg/mL)15 μ L分别滴加于纸片上,以溶剂甲醇为阴性对照,以100

U/mL 的硫酸链霉素或青霉素钠为阳性对照, 每个样品设 3 个平行, 37 ℃培养 24 h, 十字交叉法测定各样品抑菌圈的大小。

2.5 抗肿瘤活性检测

抗肿瘤活性检测采用 MTT 法^[17], 以人肝癌细胞株 HepG2 为检测瘤株。取对数生长期的肿瘤细胞 HepG2, 0.25%胰蛋白酶消化, 用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液调节细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于 96 孔细胞培养板中, 置 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中过夜。24 h 后, 每孔加入测试样品溶液, 使药物终质量浓度为 1 mg/mL^[18]。以完全培养基为阴性对照, 以 50 μg/mL MMC 为阳性对照, 每组设 5 个重复。培养 48 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL, 继续培养 4 h, 弃去孔内液体, 每孔加 100 μL DMSO, 振荡 10 min, 在 490 nm 波长处检测各孔的吸光度 (A) 值。计算细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - A_{\text{药物}} / A_{\text{阴性对照}}$$

2.6 DNA 序列分析及系统发育树构建

将活性较好的菌株送往上海生工生物有限公司进行测序, 测序获得的 ITS 序列通过 NCBI/BLAST 比对, 选择相似性最高的菌株序列, 进行多序列比对分析, 采用软件 MEGA 5.0 Neighbour-Joining (邻接法, NJ) 构建系统发育树, 与数据库中收录的同

源性高菌株的系统发育关系进行分析。

3 结果

3.1 水仙内生真菌的分离鉴定结果

采用组织切块法, 从水仙植物的不同组织共分离到 18 株内生真菌 (表 1), 其中 16 株分离于植物的根部 (占总分离菌株的 88.89%), 2 株分离于鳞茎 (占总分离菌株的 11.11%), 叶中没有获得内生真菌。由此可以看出, 水仙中存在着较为丰富的内生真菌资源, 以根部最为丰富, 究其原因, 一方面与其生活环境有关, 另一方面可能培养条件如温度、培养基组分等实验设计的单一性, 不满足部分微生物的最适培养条件, 因此在分离过程中微生物的分离株数有限。

通过形态学方法对 18 株分离菌株从菌落表面颜色、菌丝状态、菌落边缘及培养基基质颜色 4 方面进行鉴定, 结果见表 1。从表中可以看出各菌株在生长状态和形态学方面都有差异, 具有丰富菌落形态, 有毡状、绒毛状、絮状等, 各菌落色泽及产色素情况也不尽相同, 既有不产色素的, 也有黄色、灰褐色、墨绿色等, 既有边缘整齐的, 又有放射状的。SX-R202 菌落形态见图 1, 从图中可以看出该菌落形态呈现扫帚状, 有分生梗和孢子产生, 初步确定为青霉属。

表 1 水仙中分离的内生真菌的菌落形态

Table 1 Colony morphologies of entophytic fungi isolated from *N. tazetta* var. *chinensis*

菌株编号	菌落形态				来源部位
	菌落表面颜色	菌丝性状	菌落边缘	基质颜色	
SX-R101	灰绿色	表面干燥	整齐	黄色	根
SX-R102	白色	浓密、发达、絮状	放射状	淡黄转黑色	根
SX-R103	青绿色	产孢、菌丝无色	整齐	无色	根
SX-R104	灰绿色	表面干燥	整齐	白色	根
SX-R105	灰色	毡状、致密	整齐	黑色	根
SX-R106	灰白色	绒毛状、浓密	整齐	黑色	根
SX-R107	青褐色	发达、毡状	整齐	无色转褐色	根
SX-R201	白色	绒毛状、松散	放射状	黄色	根
SX-R202	青绿色、边缘灰色	干燥致密	整齐	绿色	根
SX-R203	灰粉色	绒毛状、发达	整齐	无色	根
SX-R204	白色转黑色	紧密、较发达	整齐	淡黄色	根
SX-R205	灰白色	绒毛状、浓密	整齐	黑色	根
SX-R206	白色	发达、浓密	放射状	淡黄色	根
SX-R207	灰白色	绒毛状、发达	放射状	黑色	根
SX-R208	白色转墨绿色	絮状、浓密	放射状	无色	根
SX-R209	灰白色	干燥、菌丝短、产孢	整齐	无色	根
SX-S101	灰色	致密	整齐	黑色	鳞茎
SX-S102	黄色	致密、不发达	整齐	黄色	鳞茎

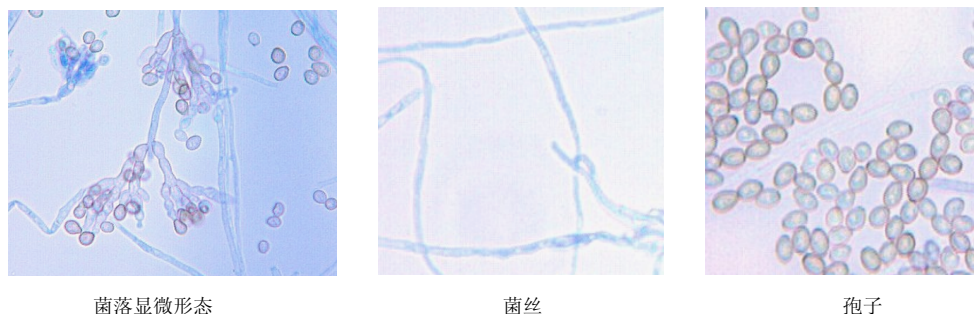


图 1 SX-R202 菌株形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of strain SX-R202

3.2 水仙内生真菌发酵液的抑菌活性

对分离纯化得到的内生真菌进行液体培养, 采用滤纸片法, 对 18 个水仙内生真菌发酵液醋酸乙酯提取物测试样品进行抑菌实验, 结果见表 2。在 10 mg/mL 质量浓度, 有 15 个测试样品至少对 1 种指示细菌的增殖具有抑制作用, 占样品总数的 83.3%, 其中对金黄色葡萄球菌具抑制作用的样品有 5 个, 占样品总数的 27.8%; 对大肠杆菌具有抑制作用的样品有 8 个, 占测试总数的 44.4%; 对肺炎克雷伯菌具有抑制作用的有 2 个, 占样品数的 11.1%; 对绿脓杆菌具抑制作用的有 8 个, 占测试

总数的 44.4%。其中 SX-R202 和 SX-S102 菌株发酵液的醋酸乙酯提取物测试样品相对于 100 U/mL 青霉素和链霉素溶液具有较好的抑菌作用, SX-R202 对肺炎克雷伯菌和大肠杆菌没有抑菌作用, 对绿脓杆菌抑菌圈直径达到 18 mm (链霉素抑菌圈直径为 23 mm), 对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径达到 19 mm (青霉素抑菌圈直径为 25 mm), SX-S102 发酵醋酸乙酯提取液测试样品对大肠杆菌抑菌圈直径达到 20 mm (链霉素抑菌圈直径为 27 mm), 对肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌没有抑菌作用。

表 2 18 株水仙内生真菌发酵液的抑菌活性

Table 2 Antibacterial activity of ethyl acetate extracts from fermentation broth of 18 strains of entophytic fungi in *N. tazetta* var. *chinensis*

样品	抑菌活性				样品	抑菌活性			
	肺炎克雷伯菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	绿脓杆菌		肺炎克雷伯菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	绿脓杆菌
SX-R101	-	-	-	++	SX-R204	++	-	-	++
SX-R102	-	-	-	-	SX-R205	-	-	++	++
SX-R103	-	-	-	-	SX-R206	-	++	-	-
SX-R104	-	++	-	+	SX-R207	-	++	-	++
SX-R105	-	++	+	-	SX-R208	-	-	-	-
SX-R106	+	-	-	-	SX-R209	-	+	-	-
SX-R107	-	-	-	++	SX-S101	-	+	+	+
SX-R201	-	+	-	-	SX-S102	-	+++	-	-
SX-R202	-	-	+++	+++	青霉素	-	-	+++	-
SX-R203	-	-	+	-	链霉素	++	+++	-	+++

“-”-无抑菌圈; “+”-7 mm ≤ 抑菌圈直径 < 15 mm; “++”-15 mm ≤ 抑菌圈直径 < 20 mm; “+++”-20 mm ≤ 抑菌圈直径 ≤ 25 mm

“-”-without diameter of inhibition zone; “+”-7 mm ≤ diameter of inhibition zone < 15 mm; “++”-15 mm ≤ diameter of inhibition zone < 20 mm; “+++”-20 mm ≤ diameter of inhibition zone ≤ 25 mm

3.3 水仙内生真菌发酵液抗肿瘤活性

采用 MTT 法检测 18 株水仙内生真菌发酵产物醋酸乙酯提取物对人肝癌细胞株 HepG2 的细胞毒性, 结果见表 3, 从表中可以看出 18 种菌株发酵液醋酸乙酯提取物测试样品在 1 mg/mL 质量浓度下

均不同程度对 HepG2 的增殖具有抑制作用, 其中抑制率在 30% 以上的有 10 株, 占总数的 55.6%; 抑制率在 50% 以上的有 4 株, 占菌株总数的 22.2%, 其中质量浓度 1 mg/mL SX-R201、SX-R202 和 SX-R204 菌株发酵液醋酸乙酯提取物测试样品作用

表 3 18 株水仙内生真菌发酵液对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

Table 3 Antitumor activity of ethyl acetate extracts from fermentation broth of 18 strains of entophytic fungi in *N. tazetta* var. *chinensis*

菌株编号	抑制率 / %	菌株编号	抑制率 / %
SX-R101	35.6 ± 1.2	SX-R204	90.6 ± 1.0
SX-R102	16.4 ± 0.2	SX-R205	6.9 ± 0.2
SX-R103	38.3 ± 0.6	SX-R206	30.2 ± 0.4
SX-R104	12.9 ± 0.1	SX-R207	10.8 ± 0.1
SX-R105	7.9 ± 0.1	SX-R208	39.1 ± 0.3
SX-R106	40.2 ± 0.2	SX-R209	4.2 ± 0.0
SX-R107	22.5 ± 0.3	SX-S101	13.1 ± 0.2
SX-R201	86.0 ± 1.1	SX-S102	36.0 ± 0.5
SX-R202	89.8 ± 1.3	MMC	86.0 ± 2.6
SX-R203	62.9 ± 0.9		

强度与阳性对照药 50 μg/mL MMC 相当, 抑制率在 86% 以上, 因此, 在后续的化合物分离鉴定及活性研究中, 将主要以 SX-R201、SX-R202 和 SX-R204 次生代谢产物作为主要研究内容, 以期获得具有良好活性的单体化合物。

3.4 系统发育分析

抑菌和抗肿瘤实验结果显示, 从水仙中分离的 18 株内生真菌中 SX-S102、SX-R201、SX-R202、SX-R203 和 SX-R204 具有较好的活性, 将各菌株的 ITS 测序序列提交到 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 中, 进行 Blast (Basic Local Alignment Search Tool) 比对分析, 得出 SX-S102 和 SX-R204 序列与曲霉属 *Aspergillus* sp.、SX-R201 与尖孢镰刀菌属 *Fusarium* sp.、SX-R202 和 SX-R203 与青霉属 *Penicillium* sp. 各菌株序列同源性在 99%, 结合菌落及菌丝等形态学特征, 进一步确定 SX-R202 和 SX-R203 为青霉菌, SX-R201 为镰刀菌, SX-R204 为泡盛曲霉, 而 SX-S102 可能为曲霉属黄曲霉。鉴于 SX-R202 具有较好的抗菌活性及抗肿瘤活性, 将其序列与同源序列绘制进化树, 见图 2。从图中可以看出 SX-R202 与青霉属的其他菌株进化距离较近, 为同一属菌株, 结合形态学特征确定 SX-R202 为青霉属菌株。

4 讨论

早在 19 世纪中叶就开始了植物内生菌的研究, 直到 1993 年, 美国蒙大拿州立大学 Strobel 从短叶紫杉 *Taxus brevifolia* Nutt. 分离得到一株内生

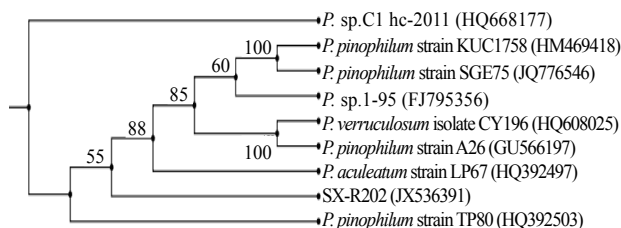


图 2 基于 ITS 序列基础上的菌株 SX-R202 与其他青霉属真菌的系统发育分析

Fig. 2 Polymeric analysis of strains SX-R202 and other *Penicillium* strains based on sequences of ITS

真菌, 其能与宿主植物产生同一产物——肿瘤治疗剂紫杉醇, 扩大了药用微生物资源的范围, 从而植物内生菌的研究开始迅速发展^[19]。

本实验以药用植物水仙为研究对象, 从中分离得到 18 株内生真菌, 发现在水仙体内内生真菌的分布部位均有差异性和专一性, 部分真菌具有组织偏好性, 根中内生真菌的菌株数多, 而茎中内生真菌的株数较少, 叶中没有分离获得内生菌, 其原因除与各部位的化学组成有差异造成内环境的差异而影响内生真菌菌群组成外, 可能与各部位的形态和生态特征有关。对各菌株发酵液的醋酸乙酯提取物的抑菌和抗肿瘤实验结果显示, 抑菌和抗肿瘤活性较好的菌株主要集中在青霉属、尖孢镰刀菌属和曲霉属。而且众多研究表明, 此类菌属的次级代谢产物通常会具有较好的抑菌活性能力^[20-21]。许婷婷等^[22]从红海榄根际土壤中分离的青霉属真菌 XGH2321 和常敏等^[23]从红海榄根际分离的土壤来源泡盛曲霉 *Aspergillus awamori* F12 两菌株发酵液醋酸乙酯提取物, 以及杜芝芝等^[24]从滑桃树分离的内生真菌镰刀菌属 *Fusarium* 2TnPl-2 发酵液都对金黄色葡萄球菌有显著的抑制作用; 李祝等^[25]研究表明黑曲霉发酵液对茄病镰刀菌亦有显著的抑菌效果。此外, 很多来源于水仙中的生物碱都具有抑制乙酰胆碱酯酶、抗肿瘤等作用, López 等^[26]利用高效液相色谱法从水仙鳞茎的甲醇提取物中分离获得 23 种化合物, 经体外抗乙酰胆碱酯酶活性测定, 都具有一定的抑制活性, 部分化合物经鉴定为石蒜碱; Liu 等^[27]先后用醋酸、氨水处理水仙的鳞茎和叶片, 并用氯仿进行粗提取, 粗提物经体外抗肿瘤活性测试, 发现水仙氯仿、乙醚提取物对 HL-60、K562、KT1/A3 和 A3R 肿瘤系具有良好的抑制作用; 同时对人类多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 具有抑制

增殖和促进凋亡的作用^[28], 根据本实验的结果发现水仙内生真菌发酵液的醋酸乙酯提取物亦具有不同程度的抗肿瘤活性, 由此进一步证实了内生真菌在长期的进化过程中能产生和宿主植物相同、类似或结构新颖的次级代谢产物。

因此, 具有抑菌和抗肿瘤活性菌株的次生代谢产物将会成为药物来源的新途径, 必将在天然药物研究中得到开发与利用, 本实验中所获得的真菌 SX-R201、SX-R202 和 SX-R204 有望成为抗肿瘤药物的新来源, 而对其抗肿瘤成分的定性、定量分析的相关研究工作正在进行中。

参考文献

- [1] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌的研究新进展 [J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.
- [2] 赫荣乔. 植物内生菌成为我国当前微生物研究领域的热点 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 1.
- [3] Jiang S, Qian D W, Yang N Y, *et al.* Biodiversity and antimicrobial activity of endophytic fungi in *Angelica sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 264-271.
- [4] Zhou X W, Zhu H F, Liu L, *et al.* A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(6): 1707-1717.
- [5] Wang Y, Dai C C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation [J]. *Ann Microbiol*, 2011, 61(2): 207-215.
- [6] Qin S, Xing K, Jiang J H, *et al.* Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(3): 457-473.
- [7] 陈向东. 植物内生菌是有待深入开发的资源宝库 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 282.
- [8] Rnsted N, Snsted V, Savolainen V, *et al.* Phylogenetic selection of *Narcissus* species for drug discovery [J]. *Bioch Systemat Ecol*, 2008, 36(5): 417-422.
- [9] 陈段芬, 高 健, 彭镇华. 水仙属植物研究进展 [J]. 水仙属植物研究进展, 2008, 44(3): 140-146.
- [10] Li X F, Shao X H, Deng X J, *et al.* Necessity of high temperature for the dormancy release of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. *J Plant Physiol*, 2012, 169(14): 1340-1347.
- [11] 解玮佳, 李世峰, 王国金, 等. 滇海水仙花的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(11): 1189-1190.
- [12] de Andrade J P, Pigni N B, Torras-Claveria L, *et al.* Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies [J]. *J Pharmac Biomed Anal*, 2012, 70: 13-25..
- [13] Řezanka T, Řezanka P, Sigler K, *et al.* Glycosides of benzodioxole-indole alkaloids from *Narcissus* having axial chirality [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(2): 301-306.
- [14] Yao X L, Zhong J H, Zheng H, *et al.* Endophytes from the pharmaceutical plant, *Annona squamosa*: isolation, bioactivity, identification and diversity of its polyketide synthase gene [J]. *Fungal Div*, 2010, 41: 41-51.
- [15] Qiu M, Xie R S, Shi Y, *et al.* Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. [J]. *Ann Microbiol*, 2010, 60: 143-150.
- [16] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [17] 赵俊霞, 袁广峰, 徐瑞雅, 等. 草菇培养物中粗三萜和黄酮含量及抗氧化抗肿瘤活性研究 [J]. 菌物学报, 2007, 26(3): 426-432.
- [18] 刘 睿, 朱天骄, 朱伟明, 等. 海洋放线菌 S1001 中抗肿瘤活性成分的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(1): 36-38.
- [19] Stierie A, Strobel G, Stierie D, *et al.* Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific Yew* [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [20] 马养民, 赵 洁. 植物内生真菌抗菌活性物质的研究进展 [J]. 有机化学, 2010, 30(2): 220-232.
- [21] 马养民, 冯成亮. 植物内生真菌抗肿瘤活性成分研究进展 [J]. 有机化学, 2008, 28(10): 1697-1706.
- [22] 许婷婷, 吴 垠, 贾阳阳, 等. 红海榄根际土壤来源的青霉菌 XGH2321 及其抑菌活性 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(11): 1682-1687.
- [23] 常 敏, 王 娟, 田 峰, 等. 红海榄根际土壤来源的泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) F12 及其代谢产物的抗菌活性分析 [J]. 微生物学报, 2010, 50(10): 1385-1391.
- [24] 杜芝芝, 宋成芝, 郁步竹, 等. 滑桃树内生真菌 *Fusarium* sp. 2TnPl-2 次生代谢产物研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(6): 452-456.
- [25] 李 祝, 葛永怡, 陈 青, 等. 黑曲霉发酵液抗真菌活性及稳定性研究 [J]. 食品研究与开发, 2011, 2(7): 141-143.
- [26] López S, Bastida J, Viladomat F, *et al.* Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and narcissus extracts [J]. *Life Sci*, 2002, 71: 2521-2529.
- [27] Liu J, Li Y, Ren W, *et al.* Apoptosis of HL-60 cells induced by extracts from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. *Cancer Lett*, 2006, 242: 133-140.
- [28] 刘 静, 胡维新, 何莉芳. 水仙提取物对人类多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 增殖和凋亡的作用 [J]. 中草药, 2005, 36(12): 1824-1827.